

MORFOGÉNESIS DE LA MÉDULA CERVICAL —INTUMESCENCIA CERVICAL— Y SU MADURACIÓN NEURONAL Y AXÓNICA POR TÉCNICAS SOMATOMIELÍNICAS DEL PERRO

Spinal cord morphogenesis —cervical intumescense— and it's neuronal and axonic maturation in the dog, by mielinic-somatic techniques

Vázquez-Autón, J. M.^{a**}; Moreno, F.*; Diz, A.** y Gil, F.*

* Departamento de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

** Departamento de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

Recibido: 15 abril

RESUMEN

Se realiza un análisis a microscopía de luz de la intumescencia cervical del perro, desde los 20 días de desarrollo embrionario hasta los 2 meses de vida postnatal, a fin de determinar los cambios cito- y morfogenéticos que en ella se producen y, poder establecer los datos más significativos de desarrollo cronológico, desde el mismo origen y evolución de las estructuras nerviosas. Las técnicas mielínico-somáticas empleadas en material de edades críticas nos permiten seguir paso a paso la diferenciación neuronal y el avance de los fenómenos de mielinización, en base a la apetencia transitoria que los elementos neuronales muestran al luxol-fast-blue (colorante mielínico), en armonía con los momentos en que la neurona se integra a la dinámica funcional de los centros nerviosos correspondientes.

Palabras clave: Médula espinal, Neuronal, Morfogénesis, Perro.

SUMMARY

An analysis with light microscopy of the cervical intumescence of the dog was carried out between the 20th day of embryonic development and the 2nd month of postnatal life, in order to determine the cyto- and morphogenetic changes, and to establish the most significant patterns of chronological development just from the origin and evolution of nervous structures. The myelinic-somatic techniques used for individuals with critical ages allow us to follow neuronal differentiation step by step, and the progress of myelination, based on the transitory affinity of neuronal elements for luxol-fast-blue (myelinic stain), which is related to the moments in which neurons are integrated into the dynamics of their correspondent nervous centers.

Keywords: Spinal cord, Neuronal, Morphogenesis, Dog.

INTRODUCCIÓN

Desde que KLÜVER y BARRERA (1953) describen y utilizan su método mielínico-somático y, lo aplican como técnica histoquímica al conocimiento de la ontogénesis, filogénesis y desarrollo del S.N.C., son numerosas las líneas en el campo de la neuroanatomía y neurohistología que siguen dichas pautas, aproximándose a establecer una cronología en la maduración de las estructuras nerviosas.

Esta cronología de maduración basada en la apetencia transitoria que las neuronas presentan al luxol-fast-blue, fue puesta de manifiesto por SMITH-AGREDA y FERNÁNDEZ-ORTEGA (1967) y comprobada por FERNÁNDEZ-ORTEGA y MESA (1972) con distintos métodos de inclusión y fijadores. Con anterioridad SMITH-AGREDA y FERNÁNDEZ-ORTEGA (1970) determinaron el momento crítico de apetencia tintorial de las neuronas del asta ventral en la médula cervical del embrión de pollo y, asimismo FE-

RRES-TORRES y FERNÁNDEZ-ORTEGA (1973) detectaron la reacción neuronal luxol-negativa de las mismas neuronas en fases previas del desarrollo. En astas ventrales de fetos humanos próximos al cuarto mes, MESA et al. (1975) analizan la maduración neuronal y TORRES-PUERTO (1981) contribuye a la maduración neuronal en la médula cervical de rata en épocas de desarrollo postnatal.

Sobre la variante mielínica, el método de Klüver-Barrera, fue aplicado por FERRES-TORRES y FERNÁNDEZ-ORTEGA (1973) al embrión de pollo y con anterioridad por JASTRZEBSKI (1970) en la mielinización de los haces espino-cerebelosos dorsal y ventral en gatos con edades fetales, juveniles y adultas.

A pesar de lo expuesto, sobre el campo de la histogénesis medular en el perro, se encuentran escasas referencias sobre todo en fases precoces de su desarrollo. En este sentido, no debemos dejar de significar, las investigaciones de FOX (1967) sobre mielogénesis en los cordones dorsal, ventral y lateral de la médula cervical canina, así como los trabajos de AGÜERA y BLANCO (1976) y VÁZQUEZ-AUTÓN (1977) sobre cronología de maduración celular y axónica sobre estos mismos sustratos nerviosos.

MATERIAL Y MÉTODO

En el presente trabajo se han utilizado médulas espinales procedentes de 27 perros en distintas fases del desarrollo, tanto prenatal como postnatal, seleccionándose de las médulas, la porción correspondiente a su intumescencia cervical.

Los embriones y fetos caninos se obtuvieron mediante cesáreas experimentales, y la edad de este material fue determinada siguiendo las pautas preconizadas por EVANS y SACK (1973) en la cronología del desarrollo de esta especie. El sustrato nervioso de animales en fase de desarrollo postnatal se obtuvo de diferentes camadas criadas y sacrificadas previa anestesia por inhalación con éter etílico.

Del material fetal y postnatal se procedió a la extracción de la médula espinal mediante laminectomías de las regiones torácica y cervical y correspondiente sección de los nervios espinales. Los embriones y las intumescencias cervicales así obtenidas, fueron fijadas en formol al 10%, estableciéndose para su estudio los siguientes grupos:

Grupo PRIMERO. Embriones en edades de desarrollo prenatal de 20 y 25 días.

Grupo SEGUNDO. Embriones de 30 días de desarrollo.

Grupo TERCERO. Material medular pro-

cedente de fetos de 45 días de desarrollo.

Grupo CUARTO. Intumescencias cervicales pertenecientes a fetos con 50 días.

Grupo QUINTO. Intumescencias cervicales de animales nacidos de 6, 12 y 24 horas de vida.

Grupo SEXTO. Segmentos cervicotorácicos de animales de 1 y 2 semanas de vida.

Grupo SÉPTIMO. Intumescencias cervicales procedentes de animales de 1 y 2 meses de edad.

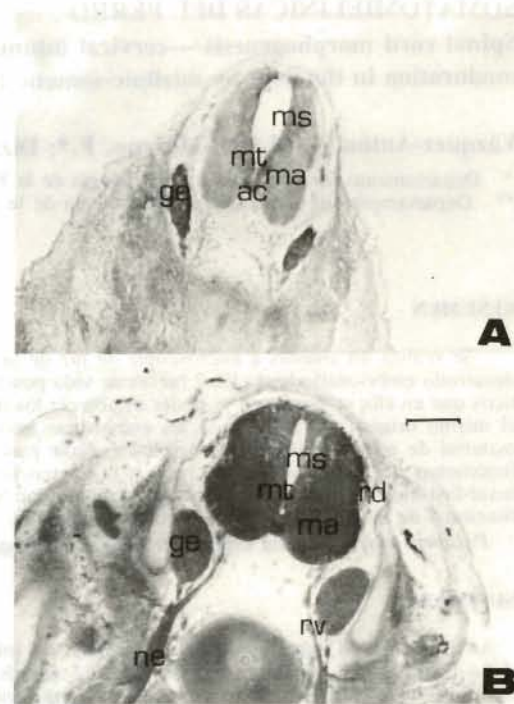


FIGURA 1. A. Corte transversal a nivel torácico de la intumescencia cervical de la médula espinal de embrión de perro de 20 días. Nótese la iniciación del cierre del surco neural y la apetencia tintorial de las paredes del canal medular. También se advierte el ganglio espinal en emigración y el elevado grado de positividad de sus células. Tinción luxol-fast-blue. $\times 40$. *ac*, acúmulo neuronal del surco ventral; *ge*, ganglio espinal; *ma*, manto; *ms*, *mt*, matrices sensibles y motoras.

FIGURA 1. B. Corte transversal de la intumescencia medular a nivel torácico de embrión de perro de 25 días. Además del cierre del surco neural se advierte una intensa apetencia tintorial de toda la pared del tubo y de los ganglios y trayectos radiculares nerviosos. Tinción luxol-fast-blue. $\times 40$. *ge*, ganglio espinal; *ma*, manto; *ms*, *mt*, matrices sensible y motora; *ne*, nervio espinal; *rd*, *rv*, raíces dorsal y ventral del nervio espinal.

Con posterioridad a la fijación referida, las muestras fueron incluidas en parafina y previo tallado cortadas a 8 micras. Los cortes se practicaron en su mayoría de forma transversal; no obstante, algunas piezas se cortaron transversal y longitudinalmente.

Los cortes así obtenidos se agruparon para estudio en dos series, en relación con la técnica de tinción empleadas:

- a) Tinción con luxol-fast-blue (método modificado de Klüver-Barrera).
- b) Tinción de Klüver-Barrera.

Una vez teñidas las preparaciones se procedió al montaje y estudio de las mismas, así como al fotografiado de los hechos más significativos.

OBSERVACIONES

De los estudios realizados en la primera de las edades embrionarias (figura 1,A) debemos

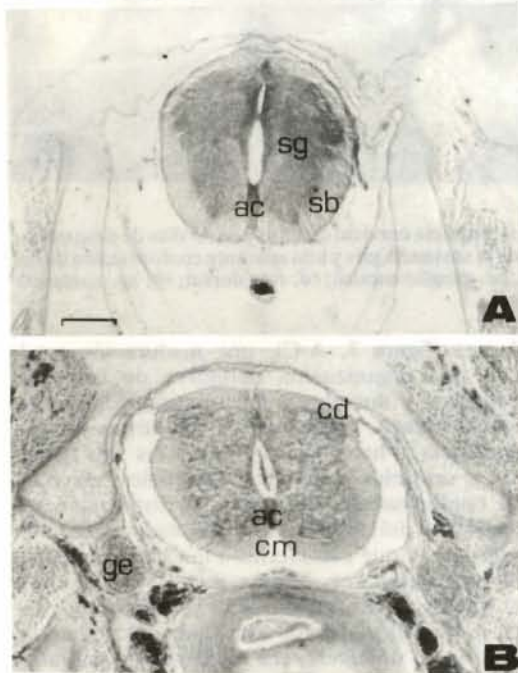


FIGURA 2. A y B. Cortes transversales de intumescencias cervicales de embriones de 30 días. Nótese la diferencia de apetencia tintorial de la sustancia gris respecto a la blanca, aunque sin una aparente conformación de las astas ni de los cordones medulares. Tinción Klüver-Barrera. La barra equivale a 250 μ m. *ac*, acúmulo neuronal del surco ventral; *cd*, cordón dorsal; *ge*, ganglio espinal; *cm*, cisura media; *sb*, *sg*, sustancia blanca y gris; *vl*, cordón ventrolateral.

significar que la médula se ofrece morfológicamente a las secciones transversales con una apariencia algo triangular, dado el enorme desarrollo operado en las primeras etapas en las astas dorsales, cierre del surco neural, así como por los procesos de emigración de los ganglios espinales. Existe apetencia por el luxol en los territorios de matriz y manto y en el acúmulo celular del surco basal. Las comunidades celulares del ganglio espinal aparecen igualmente teñidas por el luxol. A los 25 días (figura 1,B), se ha completado el cierre del surco neural en los territorios de la intumescencia cervical y aparece una fuerte actividad tintorial en todo el territorio de matriz y manto, al igual que en los ganglios espinales y en los trayectos de las raíces y nervios raquídeos.

Las observaciones sobre especímenes de 30 días de desarrollo prenatal (figura 2, A y B), ponen de manifiesto una clara apetencia al luxol por parte de la sustancia gris, mientras que la reacción tintorial en la zona fascicular es muy escasa. La matriz limitante de la cavidad endimaria, el acúmulo del surco basal y las comunidades del ganglio espinal siguen dando reacción luxol-positiva.

Sobre material medular de fetos de 45 días (figura 3, A y B) detectamos el desarrollo y extensión de las astas ventrales, aproximándose desde esta época a la disposición topográfica medular definitiva. Seguimos evidenciando diferencias significativas, respecto a la actividad tintorial de la sustancia gris y blanca; sin embargo a mayores aumentos la apetencia tintorial al luxol por parte de los elementos neuronales no resulta lo marcada que se presenta.

Analizando los cortes medulares de la intumescencia cervical de fetos de 50 días (figura 4, A-E), se detecta con nitidez la separación entre sustancia gris y blanca y la superficie de sección medular cada vez más próxima a la definitiva. Referente a la actividad tintorial de las neuronas observamos, por parte de las motoneuronas, como aparecen, en su mayoría, fuertemente teñidas por el luxol en su citoplasma y nucleolo; sin embargo, coexisten con ellas otras neuronas que carecen de esta apetencia y, unas terceras totalmente impregnadas por el colorante. Las neuronas sensitivas, en cambio, en esta época ofrecen menor afinidad al luxol. La limitante de la cavidad endimaria aparece, al igual que en edades anteriores, dotada de una gran actividad tintorial. Por parte de la sustancia blanca, la apetencia al luxol es mayor en los cordones medulares ventrales que en los dorsalaterales, donde se aprecia escasa retención del colorante a nivel del tracto corticoespinal lateral y del fascículo gracil, mientras que el fascículo cuneado aparece más aparente.

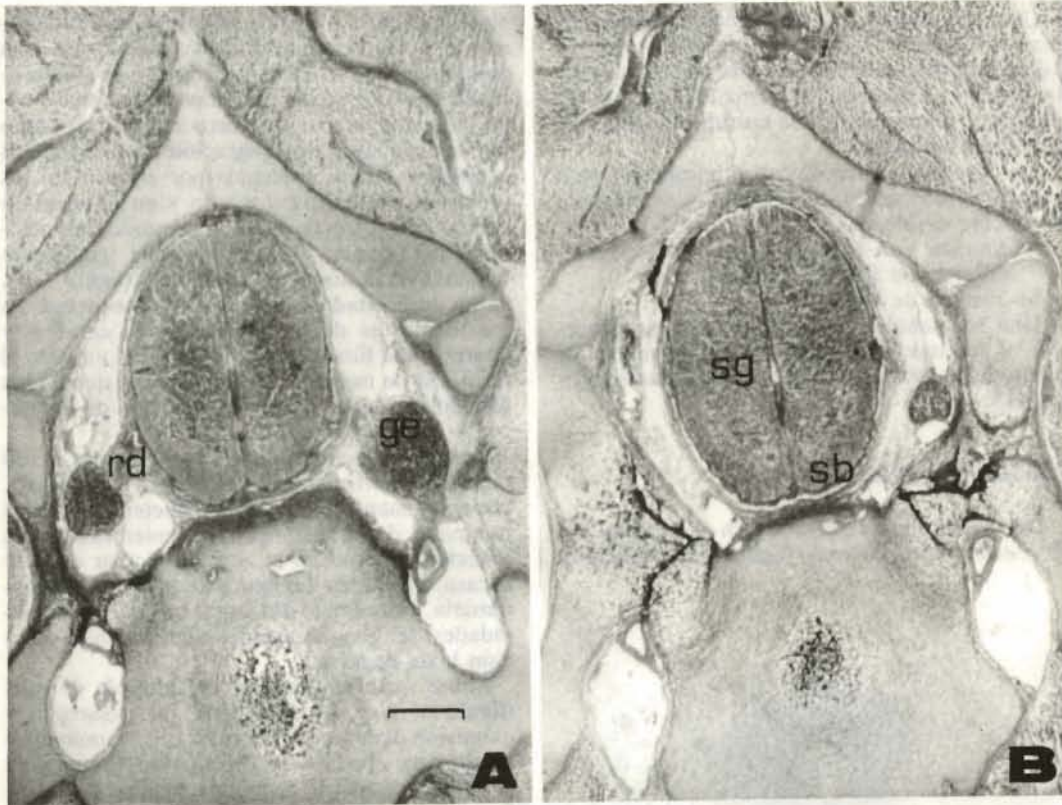


FIGURA 3, A y B. Cortes transversales pertenecientes a la intumescencia cervical de fetos con 45 días de desarrollo. En A y B se pone de manifiesto la mayor capacidad tintorial de la sustancia gris y una aparente conformación de las astas. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 250 μ m. *ge*, ganglio espinal; *rd*, raíz dorsal; *sb*, *sg*, sustancia blanca y gris.

En las muestras pertenecientes al grupo V (animales de 6, 12 y 24 horas de vida (figura 5, A-E), los resultados podrían definirse, en líneas generales, como una secuencia de los anteriormente expuesto. Efectivamente, entre otras, seguimos observando una fuerte apetencia al luxol por los cuerpos neuronales, el mayor desarrollo de la sustancia blanca y la menor afinidad tintorial de los tractos corticoespinal lateral y fascículo gracil.

En el material medular (intumescencias cervicales) de animales de 1 y 2 semanas de vida (figura 6), resulta especialmente significativo la elevada apetencia al luxol por parte de la sustancia blanca, hecho éste que nos expresa su alto grado de mielinización; mientras que por parte de las neuronas ya sean motoras o sensitivas se aprecia una actividad cromática que se va extendiendo por todo el cuerpo neuronal.

Al analizar el último grupo de estudio (animales de 1 y 2 meses de vida), observamos en las intumescencias procedentes de animales de

1 mes (figura 7, A-C), una maduración total, con una organización definitiva de las astas ventrales y dorsales y mielinización de la sustancia blanca, como nos lo demuestra la gran apetencia al luxol que presentan las vías motoras y sensibles medulares, las cuales aparecen ya configuradas conforme a la disposición topográfica del diseño convencional de sección transversal que caracteriza a la especie en estos niveles medulares. Nótese a este respecto que el tractocorticoespinal lateral y el fascículo gracil están tintorial y topográficamente definidos. A la edad de referencia se pierde la actividad tintorial por parte de las paredes que limitan la cavidad endimaria y aparecen neuronas que han perdido su actividad cromática junto a neuronas luxolpositivas. A los 2 meses de edad (figura 8, A y B), las características estructurales son similares a las de la edad anterior, desde el punto de vista tintorial se produce una falta total de apetencia al luxol-fast-blue tanto por parte de las motoneuronas como de las neuro-

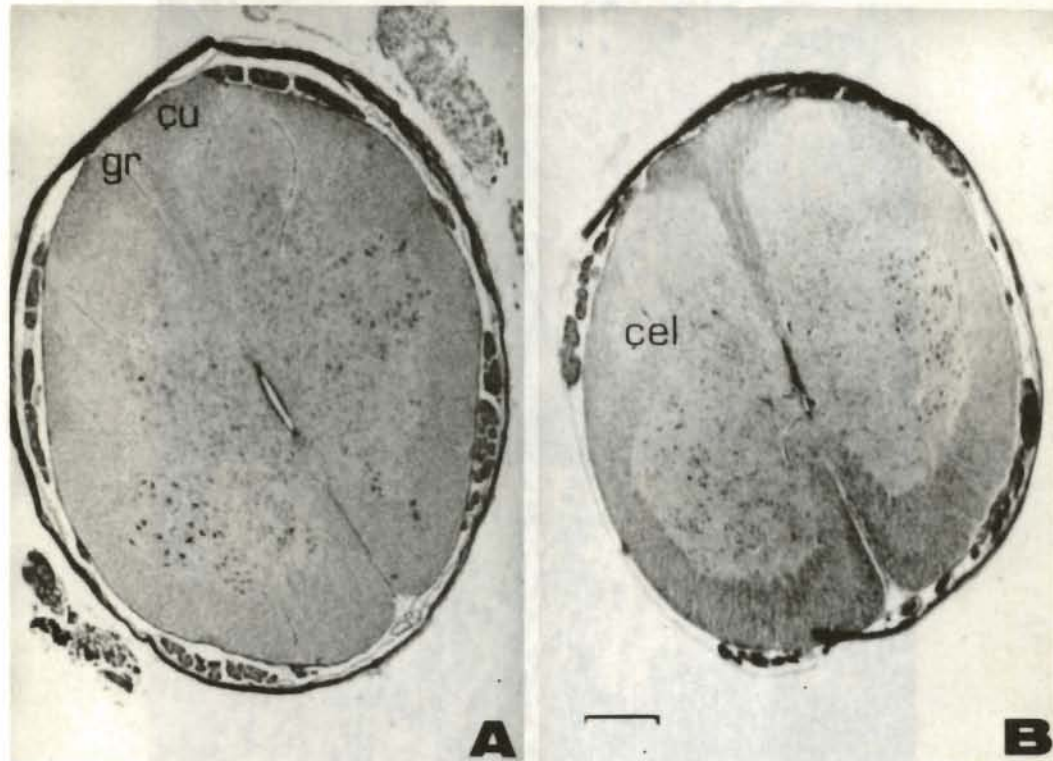


FIGURA 4, A y B. Secciones transversales de la intumescencia cervical de fetos (50 días) de perro. Se observa la disposición típica de las astas medulares y el escaso grado de mielinización a nivel de fascículo gracil y del tracto corticoespinal lateral. Tinción luxol-fat-blue y Klüver-Barrera. La barra equivale a 100 μ m. *cel*, tracto corticoespinal lateral; *cu*, fascículo cuneado; *gr*, fascículo gracil.

nas sensitivas, así como la falta de actividad tintorial que seguimos observando en las paredes limitantes de la cavidad epidimaria.

DISCUSIÓN

En las fases más precoces de nuestro estudio, edades embrionarias de 20 a 30 días de desarrollo prenatal, hemos visto que se asiste al cierre del tubo neural en los niveles de la intumescencia cervical que analizamos. Si añadimos a esto la evidente apetencia por el luxol de las placas matrices y de los elementos celulares del ganglio espinal y que es mucho más discreta en los sustratos del manto y totalmente ausente en la zona fascicular, se deduce a priori una jerarquización de actividades proliferativas que ya fueron tratadas por AGÜERA y BLANCO (1976) y VÁZQUEZ-AUTÓN (1977). Por otro lado, deberemos resaltar que la no retención a nivel de la zona fascicular del colorante en edades embrionarias de 30 días no significa la ausencia de mielina ya que esta fue puesta de manifiesto

ultraestructuralmente en los mismos sustratos por VÁZQUEZ-AUTÓN y BLANCO-RODRÍGUEZ (1983).

A los 45 días de desarrollo prenatal debemos resaltar un alto grado de diferenciación neuronal, mucho más manifiesto a los 50 días como lo demuestra la fuerte apetencia por el luxol-fast-blue que tienen los cuerpos neuronales, esta correspondencia selectividad tintorial-diferenciación celular ya fue demostrada por SMITH-AGREDA y FERNÁNDEZ-ORTEGA (1969-70) en médula de embrión de pollo. Estos hechos coinciden precisamente con los inicios de mielinización, como lo demuestra la positividad al luxol de la sustancia blanca, sobre todo a los 50 días de desarrollo prenatal, ya que como pone de manifiesto TORRES-PUERTO (1981) la apetencia neuronal al luxol supone la síntesis en el pericario de proteínas mensajeras que inducen a la oligodendroglía a la mielinización axónica. Por parte de los cordones dorsales hemos notado el menor grado de mielinización alcanzado por el fascículo gracil y por el tracto corticoespinal lateral, coincidiendo estas observaciones

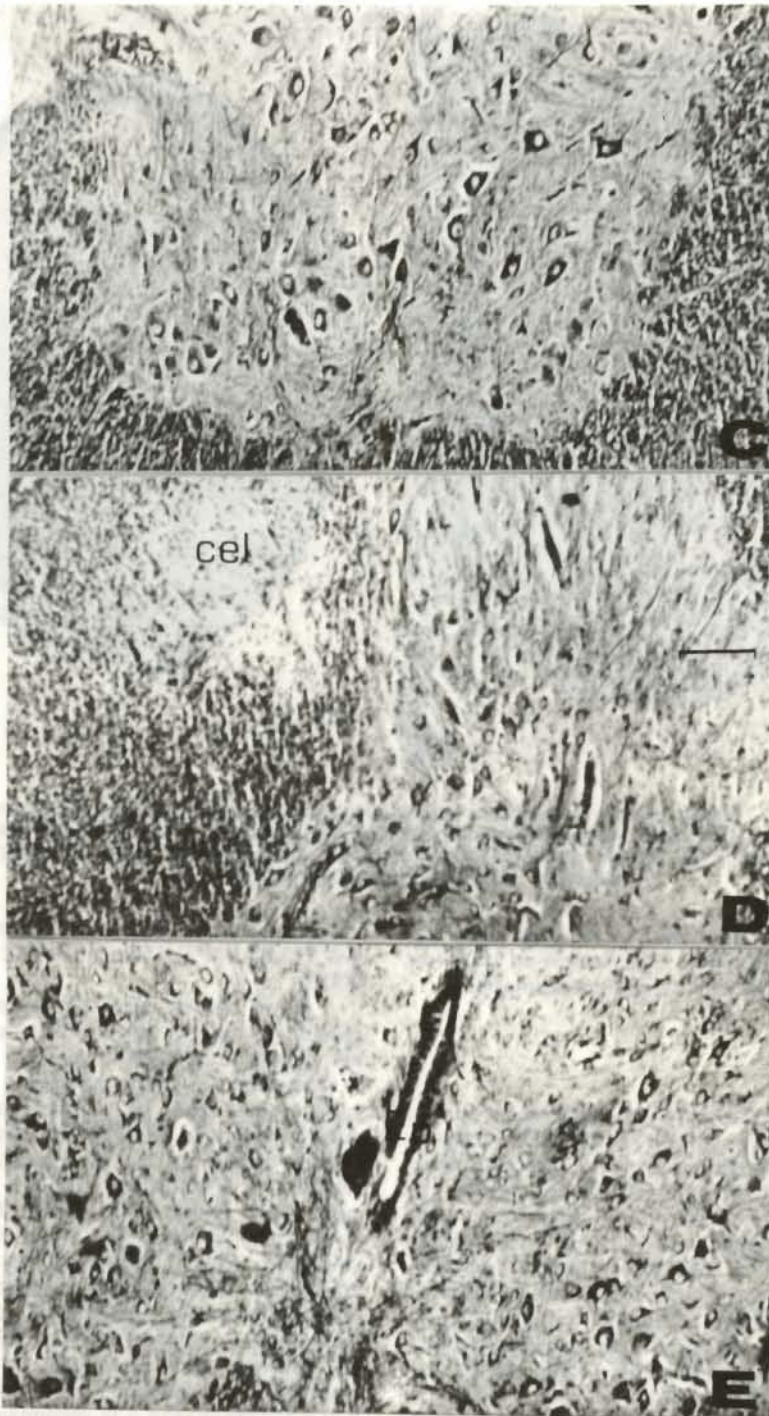


FIGURA 4, C-E. Detalle en *C* de la apatencia al luxol por parte de las neuronas de la columna ventral gris. En *D* se pone de manifiesto el escaso grado de mielinización del tracto corticoespinal lateral. En *E* se observa una fuerte apatencia tintorial en la limitante de la cavidad endimaria. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 22 μ m. Ep., cavidad endimaria; cel, tracto corticoespinal lateral.

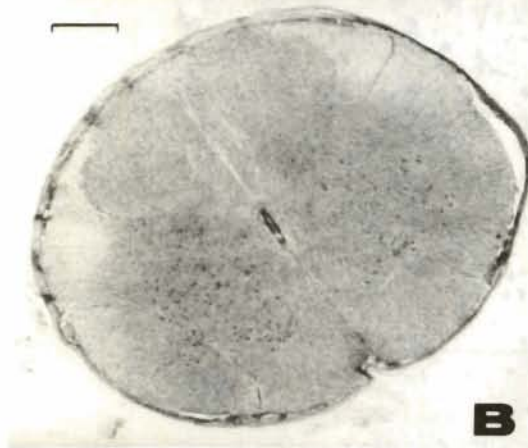


FIGURA 5, A. Corte transversal de intumescencias cervicales de perro con 12 horas. Se observa apetencia tintorial a nivel neuronal. Tinción luxol. La barra equivale a 100 μ m.

FIGURA 5, B. Sección transversal de la intumescencia cervical de perro de 1 día de desarrollo postnatal. Tinción Klüver-Barrera. La barra equivale a 160 μ m.

con las de FOX (1967). En médula canina y las de NIEBROJ-DOBOSZ et al. (1980) en médula cervical humana.

Los criterios discutidos últimamente son extrapolables a la conducta tintorial y proliferativa de centros y vías correspondientes a material medular de animales de 6, 12 y 24 horas de

edad. Así, en edades postnatales de 1 y 2 semanas asistimos a unas fases básicamente morfo-genéticas y de concreción topográfica de núcleos y vías, como lo ponen de manifiesto las intensas mielinizaciones coincidentes con las no menos fuertes reacciones cromáticas por parte del gradiente neuronal, hecho que coincide con las observaciones de FOX (1967) en la misma especie, aunque tras usar distinta técnica de tinción.

El material medular de las últimas edades consideradas, es decir, el procedente de animales de 1 y 2 meses de edad nos ha servido para comprobar, entre otros, los siguientes hechos: por un lado, el agotamiento de las actividades proliferativas de los restos matrices, como lo demuestran las reacciones tintoriales a estos niveles; por otro, el cese de las actividades en desarrollo y evolución de los elementos neuronales que dan cuenta de una incorporación propia de los centros y vías nerviosas, como asimismo lo demuestran las conductas a los colorantes específicos. Así, es característica la falta de actividad cromática en general por el luxol (sobre todo a los dos meses de desarrollo postnatal) no solamente de los elementos somáticos integrantes de las astas, sino también de las paredes limitantes de la cavidad endiaria. Es evidente que esta negatividad tintorial haya de guardar estrecha relación con el alto grado de maduración que preside en los cordones dorsal, ventral y lateral como lo expresa el hecho de que el luxol actúe únicamente como colorante mielínico sobre estos sustratos, así como sobre las fibras de la columna gris dorsal y ventral, y pierda precisamente ahora su actividad somática.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUERA, E. y BLANCO, A., 1976: Cronología de maduración funcional citoarquitectónica y mielinización de la médula cervical del perro. *An. Anat.*, **25**, 461-471.
- ARROYO-GUIJARRO, J., BARASTEGUI, C. A. y RUANO GIL, D., 1982: Ontogénesis postnatal de la región del cuerpo trapezoide en el perro. *An. Anat.*, **31**, 289-301.
- ESPEJO, J., 1975: Contribución a la maduración cronológica y funcional de centros estático-posturales en la rata blanca. *An. Anat.*, **24**, 53-78.
- EVANS, H. E. and SACK, W. O., 1973: Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anat. Histol. Embryol.*, **2**, 11-45.
- FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1969: Relación entre positividad neuronal por el luxol-fast-blue y maduración cronológica de los centros talámicos en el hombre. *An. Anat.*, **18**, 27-35.
- FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1970: Aportación a la madu-

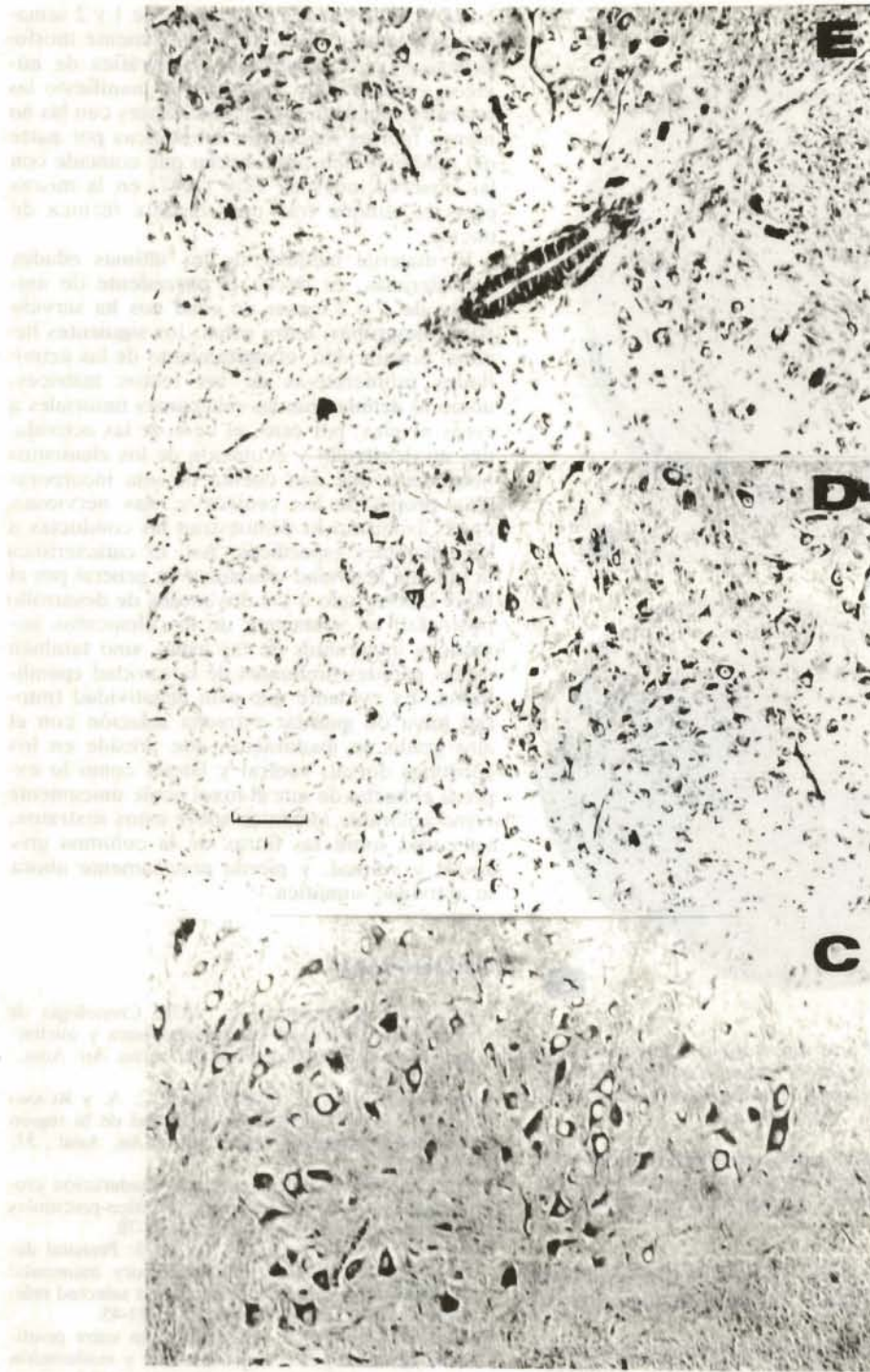


FIGURA 5, C-E. Detalle de astas ventrales, dorsales y cavidad ependimaria. Se observa apetencia neuronal al luxol y actividad tintorial en la limitante ependimaria. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 22 μ m.

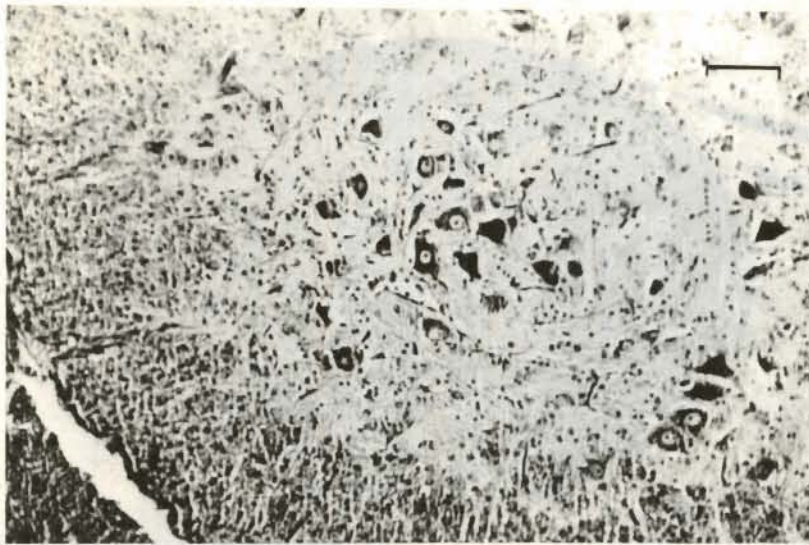


FIGURA 6. Detalle de astas ventrales de la intumescencia cervical de perro de 1 semana. Nótese que persiste la reacción neuronal positiva. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 22 μ m.

- ración cronológica del S.N.C. en la rata. I. Desde el recién nacido hasta el 18 día. *An. Anat.*, **19**, 281-298.
- FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1973: Consideraciones en relación con la maduración posnatal del S.N.C. del gato. *An. Anat.*, **22**, 53-33.
- FERNÁNDEZ-ORTEGA, I. y MESA, C., 1972: Neuronas luxol-positivas y fijadores. *An. Anat.*, **21**, 47-52.
- FERRES-TORRES, R. y FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1973: Caracteres ultraestructurales de las neuronas luxol-negativas en fases tempranas del desarrollo. *An. Anat.*, **22**, 35-40.
- FOX, M. W., INMAN, O. and HINWICH, W. A., 1967: The postnatal development of the spinal cord of the dog. *J. Comp. Neurol.*, **130**, 233-240.
- GARCÍA SANTOS, J., 1975: Aportación a la organización telencefálica de la rata blanca. *An. Anat.*, **24**, 79-107.
- GONZALO RUIZ, A., 1981: Aspectos de inducción, matrices y emigraciones de zonas rombencefálicas de significado estático-postural. *An. Anat.*, **30**, 73-93.
- JASTRZEBSKI, M., 1970: Myelination of the spino-cerebellar and pontocerebellar tracts in cattle. *Pol. Arch. Wet.*, **13**, 135-151.
- KLUVER, H. and BARRERA, E., 1953: A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J. Neuropath. Expt. Neurol.*, **12**, 400-403.
- McCLURE, R. C., 1964: The spinal cord and meninges. In: *Anatomy of the dog*, ed. by M. E. Miller, G. C. Christensen and H. E. Evans, W. B. Saunders Co., Philadelphia.
- MESA, C., FERNÁNDEZ-ORTEGA, I. y SALAS, A., 1975: Aportación a la maduración funcional de la médula espinal humana. *An. Anat.*, **24**, 129-134.
- NIEBROJ-DOBOSZ, I., FIDZIANSKA, A., RAFALOWSKA, J. and SAWICKA, E., 1980: Correlative biochemical and morphological studies of myelination in human ontogenesis. I. Myelination of the spinal cord. *Acta Neuropathol.*, **49**, 145-152.
- SMITH-AGREDA, J. M. y FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1967: Aspectos nucleares de la diferenciación neuronal en el método de Klüver-Barrera. *An. Anat.*, **16**, 227-237.
- SMITH-AGREDA, J. M. y FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1968: Aportación sobre la maduración funcional por la positividad al luxol-fast-blue. VI Cong. Soc. Anat. Esp., Santiago de Compostela.
- SMITH-AGREDA, J. M. y FERNÁNDEZ-ORTEGA, I., 1969: Positividad neuronal por el luxol-fast-blue en relación con distintos métodos de inclusión. *An. Anat.*, **18**, 7-12.
- TORRES-PUERTO, A. M., 1981: Aportaciones a la interpretación de la luxol-apatencia en el método de Lüver-Barrera. *An. Anat.*, **30**, 105-130.
- VÁZQUEZ-AUTÓN, J. M., 1977: Cronología de maduración funcional de los centros y vías medulares en relación con el plexo braquial del perro. *Arch. Anat. Embriol.*, **19**, 105-122.
- VÁZQUEZ-AUTÓN, J. M. y BLANCO RODRÍGUEZ, A., 1983: Aportaciones al estudio de la cronología del desarrollo de los territorios motores en los segmentos cervicotorácicos (intumescencia cervicales) de la médula espinal del perro. En prensa.

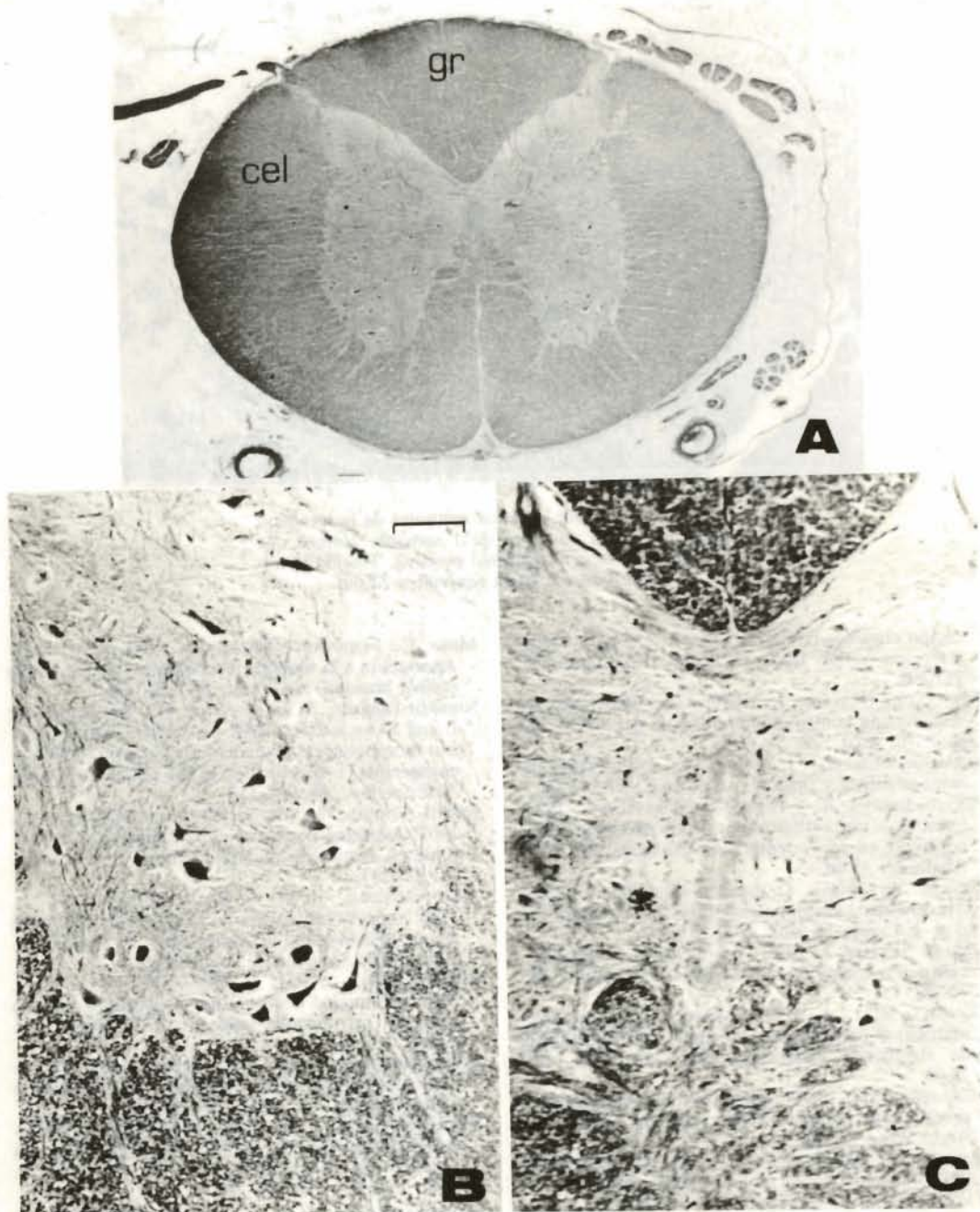


FIGURA 7. A. Corte transversal de la intumescencia de perro de 1 mes de edad, en el que se advierte la organización de las astas ventrales y dorsales y la fuerte mielinización de la sustancia blanca. Aparecen conformados y diferenciados los tractos corticoespinales laterales y los fascículos gracilis. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 166 μ m. *cel*, tracto corticoespinal lateral; *gr*, fascículo gracil.

FIGURA 7. B y C. En *B* se advierte la conducta tintorial de las neuronas del asta ventral y en *C* la pérdida de afinidad tintorial en la limitante endimaria. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 22 μ m.

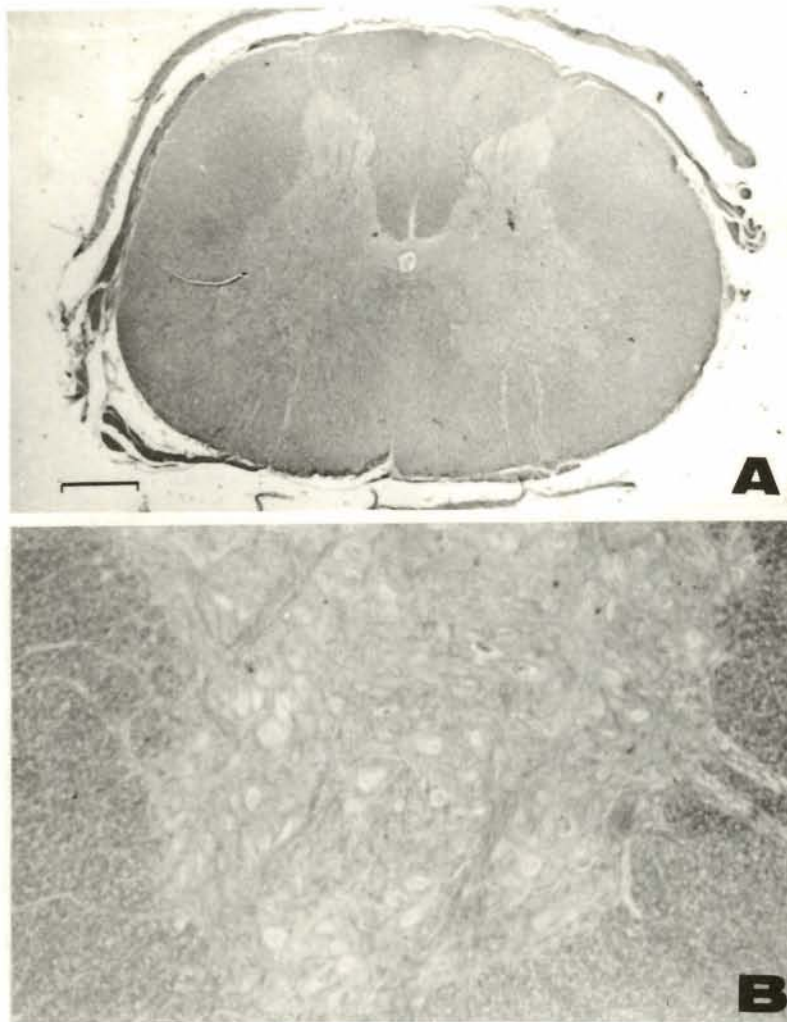


FIGURA 8, A. Sección transversal de la intumescencia cervical de perro de 2 meses de edad. Tinción Klüver-Barrera. La barra equivale a 166 μm .

FIGURA 8, B. Detalle a nivel de astas ventrales de la intumescencia cervical de perro de 2 meses. Se aprecia una falta de actividad tintorial por parte de los elementos neuronales. Tinción luxol-fast-blue. La barra equivale a 22 μm .